Protocole standardisé d'échantillonnage, de conservation, d'observation et de dénombrement du phytoplancton en plan d'eau pour la mise en œuvre de la DCE

Version 3.3.1

Septembre 2009

Christophe Laplace-Treyture, Jacques Barbe, Alain Dutartre
Cemagref
Unité de Recherche Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux
50, avenue de Verdun
F-33612 Cestas cedex

Jean-Claude Druart, Frédéric Rimet, Orlane Anneville
INRA
UMR Carrtel, 75 av. de Corzent - BP 511
F-74203 Thonon-les-Bains cedex

Cemagref Sciences, eaux & territoires

INRA

SOMMAIRE

Introduction

Ce document vise à proposer un cadre pour l'échantillonnage, la conservation, l'observation et le dénombrement des communautés phytoplanctoniques dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et un cadre d'acquisition des éléments physico-chimiques obligatoirement associés. Il est le résultat des expériences acquises au cours des 500 relevés de phytoplancton réalisés sur plus de cent lacs du territoire français stockés dans la base Plan d'eau du Cemagref obtenus pour partie dans le cadre de relevés types « Diagnose Rapide » (Cemagref, 2003) ainsi que de l'intégration des exigences de la DCE et de la norme européenne NF EN 15204 (2006).

Ce protocole s'applique à **l'ensemble des plans d'eau français** qu'ils soient profonds ou de faibles profondeurs, stratifiés ou non.

Une uniformisation de la collecte des données est indispensable afin d'assurer la bancarisation des informations sur le phytoplancton dans le cadre de la mise en œuvre de la DCE sur les plans d'eau et la mise en place des Réseaux de Contrôle et de Surveillance (RCS) et de Référence (RR). Une base de données cohérente à l'échelon national contenant des données comparables est également indispensable pour être en mesure de faire évoluer l'indice planctonique de la Diagnose Rapide et le rendre « DCE compatible ».

Ce travail est le fruit de la collaboration entre l'unité de Recherche Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux du Cemagref de Bordeaux et l'INRA de Thonon-les-Bains à laquelle s'est ajoutée la contribution de Maria Leitao du bureau d'étude Bi-Eau.

1 CAMPAGNES DE PRELEVEMENT

Le choix des périodes de prélèvement est le premier élément crucial dans l'analyse des communautés phytoplanctoniques. Leur mauvais positionnement dans l'année entraîne des biais (manque de certains cortèges algaux) dans l'interprétation des données collectées.

4 campagnes de prélèvement sont préconisées durant l'année dont **3 durant la période « estivale »** soit entre **« mai et octobre »,** et placées de la manière suivante :

- la première entre **mi-février et fin mars**, fin de l'hiver, correspondant à la période de brassage et à la toute première phase de croissance du phytoplancton (c'est parfois la seule dans les milieux très oligotrophes) ;
- la deuxième entre **mi-mai et fin juin** durant la mise en place de la thermocline (si une thermocline est présente sur le plan d'eau considéré) correspondant à la phase printanière de croissance du phytoplancton. Il faudra éviter autant que possible la phase des eaux claires, présentes sur certains types de plan d'eau, causée par un maximum de broutage par le zooplancton (transition entre les communautés printanière et estivale) ;
- la troisième en **juillet ou en août**, en plein été, quand la thermocline est bien installée correspondant à la deuxième phase de croissance du phytoplancton et ;
- la quatrième entre **septembre et mi-octobre**, en fin de stratification estivale, avant que la température ne baisse et que la stratification ne disparaisse. A cette période, l'épilimnion a une épaisseur maximale.

Pour les plans d'eau dont les eaux peuvent être **gelées en hiver**, les périodes de campagnes doivent être adaptées comme suit :

- la toute première doit se faire dès la sortie de l'hiver mais pas avant mi-février, **après la déglaciation**, cela peut aller jusqu'en mai ;
- la seconde doit se faire en **juin** ;
- la troisième en **juillet ou en août** et ;
- la dernière en **septembre**.

Cette adaptation des périodes de campagne permet de tenir compte de la présence d'une période végétative plus courte en altitude.

Un intervalle minimum de **3 semaines** doit être respecté entre chaque campagne afin de bien couvrir l'ensemble de la période de végétation et de ne pas disposer de campagnes trop rapprochées. Aucune campagne de prélèvement ne doit être réalisée en dehors de ces périodes pour ne pas fausser l'homogénéité et la représentativité des données collectées au cours des quatre campagnes. Ceci implique aussi que toutes les campagnes doivent être effectuées au cours du **même cycle annuel**.

Dans le cas où ces consignes ne peuvent pas être respectées, en raison d'imprévus constatés en cours d'échantillonnages, mentionner clairement la date de la campagne posant problème afin qu'elle soit facilement identifiée comme telle. En cas de **vent soutenu**, à partir de **force 3, « petite brise »** (soit à partir d'environ 12 km/h, très petites vagues inférieures à 0,6 m, les crêtes commencent à déferler, les moutons apparaissent) la campagne ne doit pas être réalisée mais doit être reportée à une date ultérieure.

Pour chaque campagne de mesure et/ou de prélèvement, une fiche générale de campagne, donnant les principaux éléments signalétiques généraux de la campagne (nom du plan d'eau, identité des préleveurs, dates/heures de début et de fin, conditions météorologiques, le cas échéant variations météorologiques susceptibles d'influer sur les mesures et échantillonnages, couleur de la colonne d'eau, bloom algal, points particuliers à signaler, notamment marnage constaté, nature des échantillonnages réalisés ...) doit être remplie. Voir document informatif type en Annexe 1.

2 CHOIX DE LA STATION DE PRELEVEMENT

Le site d'échantillonnage doit être à une distance suffisante de la berge pour s'affranchir des contaminations par les algues périphytiques et par les efflorescences accumulées sur les berges par les vents.

Une seule station de mesure est requise, localisée à la verticale du **point de plus grande profondeur** et, pour les retenues artificielles, en dehors de la zone d'influence du barrage (souvent matérialisée par une ligne de bouée). Une carte bathymétrique précise du plan d'eau permet le repérage de la zone la plus profonde. En l'absence de carte bathymétrique un relevé au sondeur pour repérer cette zone profonde est nécessaire.
Dans ce cas une carte topographique au 1/25 000ème peut faciliter le repérage de la zone du plan d'eau susceptible d'héberger la zone profonde afin de gagner du temps dans cette prospection avec le sondeur.
Une fois localisée, cette station doit être positionnée au GPS afin de pouvoir être retrouvée à chaque campagne. Un document reprenant le descriptif de cette station (voir en Annexe 2 un exemple de fiche descriptive) doit être élaboré.

3 PRELEVEMENTS ET PARAMETRES MESURES

3.1 Physico-chimie de terrain

Sur cette station doivent être réalisées diverses mesures de physico-chimie de terrain indissociables de l'étude du phytoplancton. Il s'agit de :

- la **transparence**, évaluée au moyen du disque de Secchi (EN ISO 7027, 2000) ; elle permet de calculer la profondeur du prélèvement intégré,
- **des profils verticaux**, de la surface jusqu'à un mètre au-dessus du fond, de la température, du pH, de la conductivité et de l'oxygène dissous (mg/l et %) mesurés tous les mètres, voire 50 cm si le plan d'eau est très peu profond (inférieur à 5 m), dans la mesure du possible. Pour les lacs ayant une profondeur maximale supérieure à 20 m une mesure tous les 5 m au delà de 20 m s'avère suffisante.

N.B. : un profil vertical de la chlorophylle-a mesuré *in-situ* à l'aide d'un capteur optique spécifique (sonde multi-paramètres par exemple) apporte également de précieux compléments d'information. De même des profils verticaux des formes de l'azote et du phosphore peuvent aider à l'interprétation des résultats de phytoplancton.

Le profil de température permettra d'identifier la présence d'une thermocline. Tous les profils physico-chimiques réalisés faciliteront l'interprétation des données phytoplanctoniques. L'ensemble des données sera consigné sur un document type identique pour chaque plan d'eau; voir document informatif type en Annexe 1.

3.2 Prélèvement de phytoplancton

L'échantillon de phytoplancton est prélevé lors de chaque campagne dans **la zone euphotique (Z_{eup})** correspondant à la tranche d'eau comprise entre la surface et **2,5 fois** la profondeur de disparition du disque de Secchi. Il est alors pris sous la forme d'un prélèvement intégré sur cette profondeur. Lorsque la **Z_{eup} est supérieure à la profondeur** le prélèvement intégré est réalisé de la surface jusqu'à **1 m au-dessus du fond**.

Pour ce faire une bouteille intégratrice modèle commercial ou type INRA (Pelletier, Brevet INRA 1978) montée sur un cordage gradué ou sur un treuil avec compteur peut être utilisée (Annexe 3). A défaut la technique du tuyau[1] (décrite dans la norme NF EN 15204, détaillée en Annexe 4) ou une bouteille de type Van Dorn ou encore une pompe peuvent être employées. Dans les deux derniers cas un volume donné (0,5 ou 1 l) est prélevé <u>au minimum tous les mètres</u>, ou tous les 0,5 m si la profondeur du plan d'eau est faible, pour être mélangé dans un plus grand récipient (type seau) dans lequel le prélèvement de phytoplancton sera réalisé. Il sera impératif alors de bien veiller à ne pas conserver ce seau sous une insolation ou une pluie directe pouvant modifier la qualité de l'échantillon et à homogénéiser le contenu du seau immédiatement avant le prélèvement du sous-échantillon.

Les prélèvements avec des bouteilles intégratrices (ou la technique du tuyau) ont l'avantage de donner un échantillon d'un volume conséquent homogène représentatif de l'ensemble de la zone euphotique échantillonnée.

Il est important dans tous les cas que le moyen de prélèvement soit associé à un système fiable et précis de la mesure de la profondeur d'échantillonnage (cordage gradué, treuil avec compteur centimétrique).

En complément il est fortement préconisé de faire un prélèvement au filet (30 µm de maille) sur un trait vertical de la zone euphotique afin de disposer de suffisamment de matériel pour faciliter certaines identifications taxinomiques (qualitatif). Le concentré est récupéré dans un flacon et fixé au lugol, au glutaraldéhyde ou au formol (voir paragraphe 4.2 pour les concentrations).

Un aliquote de l'échantillon (venant de la bouteille intégratrice, du tuyau ou du seau) est prélevé et conservé dans un flacon à large col en **verre ou en polypropylène** (PP) transparent et propre d'une contenance de **500 ml**. Le polyéthylène (PE) est déconseillé car il absorbe l'iode contenu dans le fixatif employé (Lugol). Les flacons colorés sont à éviter car ils masquent la couleur de la fixation au Lugol. Le remplissage du flacon ne doit pas se faire jusqu'en haut pour permettre une bonne homogénéisation de l'échantillon avant la prise de sous-échantillon pour comptage.

[1] Il peut être employé un tuyau d'arrosage translucide de 25 mm de diamètre, lesté au bout avec crépine et vanne quart de tour et d'une longueur de 10 m, voir schéma en Annexe 4.

D'autre part, une fiche « mesures et échantillonnages» spécifique à chaque campagne permettra de recenser par écrit les résultats des mesures physico-chimiques réalisées sur le terrain et de récapituler le détail de l'échantillonnage y compris le moyen de collecte employé à cette date sur le plan d'eau, ainsi que la nomenclature utilisée pour identifier l'échantillon ; voir document informatif type en Annexe 1.

3.3 Prélèvement pour la mesure de chlorophylle-a

Pour chacune des campagnes de mesures, un sous-échantillon, issu du prélèvement intégré (cf. paragraphe 3.2) pour analyse des pigments chlorophylliens au laboratoire est requis. Ainsi, de même que pour le phytoplancton, l'analyse de la chlorophylle-a et des phéopigments sera réalisée sur l'échantillon intégré sur la zone euphotique. **Un litre d'eau** stocké dans un flacon propre est en général nécessaire et suffisant quel que soit le niveau de trophie du plan d'eau.

Dans la mesure du possible, l'échantillon doit être filtré sur le terrain, à défaut le soir même au laboratoire, à l'aide d'une pompe à vide (manuelle ou électrique), après **homogénéisation de l'échantillon**, sur un filtre en fibre de verre ou en acétate de cellulose de 0,7 µm de pores (type GF/F de Whatman). Le volume filtrable dépend de la nature et de la quantité de matières en suspension présentes dans l'eau. On filtre alors si possible 1000 ml sinon un volume inférieur, **à noter impérativement**, en s'assurant que la durée de filtration n'excède pas 10 minutes et que la dépression nécessaire à la filtration est la plus faible possible (NF T 90-117, 1999).

Le filtre est alors placé dans un tube à centrifugation de 15 ml à usage unique (pour éviter toute contamination) puis stocké immédiatement au froid à 4 degrés et à l'obscurité jusqu'à l'extraction ou congélation au laboratoire. Sont inscrits sur le tube le nom du plan d'eau, la date et le volume filtré. Ces informations sont aussi inscrites sur la fiche « données générales » de la campagne.

Rappel : il ne faut en aucun cas toucher les filtres avec les doigts mais utiliser des pinces pour les manipuler (risque de détérioration par l'acidité des mains).

3.4 Prélèvement pour les mesures chimiques en laboratoire

Comme il est préconisé par ailleurs dans la circulaire « surveillance » DCE 2006/16 de juillet 2006, un échantillon d'eau issu du prélèvement intégré doit être fait pour réaliser des analyses chimiques en laboratoire. Ces analyses comportent entres-autres les formes de l'azote (nitrate, nitrite et azote Kjeldahl) et du phosphore (phosphore total et orthophosphates) contribuant à l'interprétation des données phytoplanctoniques. La liste complète des paramètres à analyser est contenue dans la circulaire « surveillance ».

Pour ce faire, un volume de 1 à 2 litres d'eau est requis dans des flacons propres étiquetés du nom du plan d'eau, de la date et de la profondeur de la zone échantillonnée. Leur conservation doit se faire à 4°C et à l'obscurité jusqu'à l'analyse au laboratoire qui doit débuter le plus tôt possible après le prélèvement.

4 CONSERVATION DES ECHANTILLONS

4.1 Pour analyse de la chlorophylle

A défaut d'une filtration sur le terrain, l'échantillon pour analyse de la chlorophylle est stocké dans un flacon d'un litre en polyéthylène (PE) stérile, à usage unique, et conservé à l'abri de la lumière dans une glacière à 4°C jusqu'au transfert au laboratoire d'analyse. La conservation en glacière permet aussi de protéger de la lumière l'échantillon sur filtre destiné au dosage de la chlorophylle.
L'échantillon sur filtre peut être congelé, pour analyse ultérieure, 12 mois maximum.

Le reste du document ne concerne plus que l'étude du phytoplancton en laboratoire, l'analyse de la chlorophylle et des phéopigments se faisant suivant les protocoles décrits dans la norme (NF T 90-117, 1999). Les chlorophylles a, b et (c_1 + c_2) peuvent être aussi déterminées, et apporter des informations complémentaires, à l'aide des formules modifiées de Jeffrey & Humphrey (Arar, 1997).

4.2 Pour analyse du phytoplancton

L'échantillon de phytoplancton est fixé sur le **terrain** à l'aide d'une solution de Lugol alcalin du commerce ou préparée (voir détail en Annexe 5) afin d'obtenir une concentration finale d'environ 0,5 % dans l'échantillon, soit **environ 8 gouttes pour 100 ml** (ou 2,5 ml pour un flacon de 500 ml). Cette concentration finale peut s'apprécier à la couleur brun clair, orangée (whisky) que doit avoir l'échantillon. En fonction du type de milieu (acidité de l'eau par exemple), la couleur orangée peut être obtenue avec un nombre nettement supérieur de gouttes.

Une décoloration peut se produire avec le temps et/ou la lumière, dans ce cas rajouter quelques gouttes de Lugol pour maintenir la fixation de l'échantillon. Le volume de conservateur ajouté doit être noté car il participe au volume final de l'échantillon.
L'échantillon ainsi fixé peut être conservé au maximum **3 semaines** à l'obscurité avant analyse ou 12 mois s'il est maintenu au froid et à l'obscurité entre 1 et 4 °C.

Pour une conservation de plus **longue durée** une fixation complémentaire s'impose : glutaraldéhyde ou formol. Ce dernier présente l'inconvénient de décolorer les cellules et d'entrainer la perte des flagelles de cellules fragiles avec le temps.
L'utilisation du **glutaraldéhyde** est alors préférée : elle se fait à une concentration finale dans l'échantillon de 0,5 %. L'utilisation du **formol** doit se faire à une concentration finale de 5 % dans l'échantillon. Voir détail des préparations des solutions mères en Annexe 5.

Ces deux produits sont à manipuler avec précaution car dangereux pour la santé.
Le **formol** est toxique par inhalation, par ingestion et par contact avec la peau. Il est classé depuis 2004 dans les substances cancérigènes (toxique de catégorie C).
Le **glutaraldéhyde** est toxique par inhalation et par ingestion et provoque des brulures.

5 ANALYSE DU PHYTOPLANCTON

L'analyse du phytoplancton dans ce cadre se fait conformément aux recommandations de la norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée - norme (NF EN 15204, 2006), de décembre 2006 - correspondant à la méthode d'Utermöhl (1958) adoptée au niveau européen. **Quelques précisions sont cependant nécessaires pour homogénéiser l'acquisition des données**.

5.1 Préparation et calibrage du matériel

5.1.1 Matériel nécessaire

Il faut disposer :

- d'un microscope inversé comprenant :

- des oculaires de x10 ou x12,5 possédant pour l'un, un micromètre oculaire et pour l'autre un réticule quadrillé (indispensable dans le cas de comptage en transect) ;
- des objectifs x10, x20 et x40 possédant des distances de travail importantes et une ouverture numérique supérieure à 0,5. Des objectifs x60 ou x100 sont aussi recommandés pour l'identification et les mesures de biovolume des petites espèces ;
- un système de contraste de phase et/ou contraste interférentiel (Normarski – DIC) ;
- un système de prise de vue (caméra ou appareil photo) peut s'avérer très utile pour des validations d'identifications, prises de mesures, constitution d'algothèque.

- de chambres de sédimentation de **10 à 50 ml** de capacité et d'un diamètre de 25 mm environ. Les chambres de 100 ml seront à éviter en raison du fort risque de sédimentations non homogènes.

- De l'eau du robinet contenant du lugol à une concentration identique à celle des échantillons (0,5 % - coloration orange) pour réaliser les dilutions si nécessaire ;

- Des éprouvettes de 250 ou 100 ml pour les concentrations des échantillons ayant de faibles densités algales (eaux très oligotrophes) ;

- Des pipettes graduées de 1, 10 ml ou plus pour mesurer les volumes pour les dilutions et concentrations.

5.1.2 Calibrage du matériel

Chaque chambre de comptage doit être identifiée par **une marque unique** et doit porter l'indication de **sa surface**. Cette dernière est calculée en mesurant **5 fois le diamètre** à l'aide d'un pied à coulisse par exemple. Le diamètre moyen est alors pris pour calculer la surface avec la formule πr^2.

De même **chaque colonne de sédimentation** doit être identifiée par **une marque unique** et doit porter l'indication de **son volume (associé à une chambre de comptage donnée). Le volume de chacune des chambres** doit être mesuré précisément (par exemple une chambre de « 5 ml » peut varier de 4,7 à 5,2 ml).

Pour mesurer le volume de la chambre il faut tout d'abord la peser vide mais complète (chambre de comptage avec lamelle+colonne d'un volume donné+lame de fermeture en verre). Puis il faut la remplir d'eau distillée et la repeser. Le **poids en grammes est équivalent au volume en millilitre**. Répéter ces opérations **trois fois** et relever la valeur moyenne du volume.

Il est entendu que l'ensemble de ces opérations, diamètre et volume, ne sont à faire qu'une seule fois mais pour chaque couple : chambre de comptage + colonne d'un volume x (par exemple chbre1 + colonne 10ml, chbre1 + colonne 25 ml, chbre2 + colonne 10 ml,...). Il est alors important de bien **identifier ces couples** par des marquages uniques.

Les **oculaires** avec micromètre et réticule gradué ainsi que **les différents objectifs** doivent être calibrés à l'aide d'une **lame micrométrique** (par exemple 100 µm divisés en 10 divisions de 10 µm) à poser sur la platine porte objet.

Les dimensions et les **surfaces des champs** de comptage, des **transects** et de la **chambre entière** si nécessaire doivent être calculées pour chacun des grossissements employés.

5.2 Préparation de l'échantillon

Les différents éléments constituant la chambre de sédimentation (support, colonne, lames de verre) doivent être propres et sec. Pour cela un nettoyage à l'éthanol et un séchage entre deux utilisations est nécessaire.

L'échantillon et la chambre de sédimentation doivent être mis à la même température, ambiante en général, afin de permettre une sédimentation aléatoire du phytoplancton dans la chambre de sédimentation. Cela est d'autant plus nécessaire que l'échantillon était conservé au froid.

L'échantillon est alors **doucement agité pendant au moins une minute afin d'homogénéiser son contenu**, **quelques minutes** peuvent s'avérer nécessaires lorsque des agglomérats subsistent dans l'échantillon, puis un sous-échantillon est versé dans la chambre de sédimentation. Des **chambres de 50, 25 ou 10 ml** sont généralement suffisantes. Les chambres de 25 ou de 50 ml s'avèrent indispensables pour des plans d'eau très oligotrophes (concentrations algales très faible de l'échantillon) et celles de 1 ml (par exemple type Kolkwitz) à 10 ml conviendront pour des plans d'eau méso-eutrophes à hyper-eutrophe. La consigne est de disposer de suffisamment de matériel biologique sédimenté sans qu'une concentration trop élevée ne provoque des chevauchements des individus nuisant à leur identification et à leur comptage suivant la méthode décrite ci-après. La règle générale est d'atteindre environ **4 individus par champ** à un grossissement de x400. On peut s'aider du tableau de l'Annexe 6 pour choisir le volume à sédimenter.

Si une dilution ou une concentration est opérée elle devra être précisée pour en tenir compte lors des calculs préalables au rendu du résultat de comptage (voir les détails de la préparation et l'utilisation de la chambre de sédimentation dans la norme NF EN 15204).

Si une grande quantité de cyanobactéries flottantes en surface est présente dans l'échantillon il peut être ajouté 5 à 10 gouttes d'acide acétique glacial directement dans l'échantillon avant homogénéisation.

La chambre ainsi remplie, doit être laissée à l'obscurité à température ambiante et dans un lieu sans vibration afin de permettre une sédimentation correcte de l'échantillon. La règle pour le temps de sédimentation est de **4 heures par cm de hauteur de colonne de sédimentation** pour un échantillon d'eau douce fixé au Lugol.

Ainsi un échantillon placé dans une chambre de 50 ml dont la colonne ferait 9 cm de haut devra sédimenter 36 heures (16 heures pour 25 ml). Pour les chambres de volume compris entre 1 et 5 ml il est préconisé d'attendre 2 heures par précaution.

Pour les chambres de plus de 1 ml, à la fin de cette phase de sédimentation, faire glisser la partie supérieure de la chambre (la colonne) et placer une fine lame en verre sur la chambre de comptage pour la fermer. Il faudra éviter d'emprisonner des bulles d'air qui peuvent gêner le comptage.

5.3 Identifications

Les déterminations requièrent parfois des observations préalables au comptage réalisées au microscope droit entre lame et lamelle afin d'établir la liste floristique. Une préparation de lame de diatomées en parallèle (cf. NF-T90-354) est aussi nécessaire lorsque les diatomées sont abondantes (supérieure à environ 20 % en nombre d'individus) dans l'échantillon et non identifiables sans préparation particulière.

Toutes les identifications taxinomiques sont réalisées au niveau spécifique ou en cas de difficultés ou d'incertitudes à un niveau moindre (genre, classe,…), à l'aide des ouvrages de détermination disponibles.

Il est important de se rappeler qu'il vaut mieux une bonne détermination à un niveau taxinomique moindre qu'une mauvaise à un niveau supérieur.

Les ouvrages peuvent être ceux de Bourrelly (1981, 1986, 1990), Compère (de 1986 à 2002), John et al. (2002), Komarek & Anagnostidis (1999, 2005), Komarek et al. (1983), et Leitao et al. (2005) pour les principaux mais aussi d'autres, plus anciens, comme la collection « Die Binnengewasser – Das Phytoplankton des Susswassers Systematik und Biologie » ou la « L. Rabenhorst's Kryptogamen – Flora ». Une liste plus complète de ces ouvrages figure en bibliographie.

La liste taxinomique de référence comportant les noms utilisés, des synonymes et la phylogénie des espèces ainsi que la codification SANDRE[2], sera utilisée comme référence pour nommer les taxa rencontrés (elle est accessible au sein d'un outil de comptage en téléchargement sur le site Internet du Cemagref[3]).
Le nom de la personne ayant réalisée ces identifications sera associé à la liste des déterminations.

5.4 Comptages

Un examen rapide de la chambre, au plus faible grossissement (x4 ou x10), permet de choisir la stratégie de comptage et de vérifier que la répartition des algues est homogène. Si la répartition n'est pas homogène un nouvel échantillon doit être préparé. Le comptage est ensuite réalisé soit sur **des transects** soit sur plusieurs **champs choisis aléatoirement** dans l'ensemble de la chambre de comptage (voire l'ensemble de la chambre) habituellement à un **grossissement de x400**.

Dans le premier cas, **1 à 4 transects** peuvent être nécessaires. Dans le deuxième cas, un nombre de **30 champs minimum** est préconisé. Le déplacement d'un champ à un autre doit se faire sans regarder dans les oculaires afin de ne pas biaiser le relevé. La méthode des champs s'avère être la plus rapide et la plus précise.

En plus des règles générales de comptage (NF EN 15204) dans des champs avec ou sans grille de comptage, il est entendu que tout **filament par longueur de 100 µm, colonie ou coenobe** compte pour **un individu**.

[2] http://sandre.eaufrance.fr/
[3] http://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/

Ainsi compte pour un individu :

- un coenobe de *Scenedesmus* composé de 4 cellules ;
- une colonie *d'Asterionella formosa* souvent composée de 8 à 10 cellules ou,
- un *Cryptomonas* composé d'une seule cellule ;
- dans le cas de filaments, ils sont comptés par unité de 100 µm de long. Ainsi un filament de *Planktothrix* de 230 µm de long compte pour 3 individus. De la même façon un filament dont la longueur est inférieure à 100 µm compte aussi pour un individu.

L'effort de comptage porte sur une surface connue (transects, champs) sur laquelle **400 individus minimum** doivent être comptés, tous taxons confondus sur l'échantillon. Dans le cas d'un comptage sur des champs aléatoires en présence d'une répartition proche de 4 individus par champ, il faudra alors comptés environ 100 champs.

Si le nombre de 400 individus n'a pas pu être atteint une justification précise devra être fournie. Le nombre de champs ou de transects nécessaires est noté.

Au sein de ces individus le **nombre de cellules par individu** sera compté directement par l'opérateur sur l'échantillon pendant le comptage lorsque l'observation le permet. Dans le cas d'organismes pluricellulaires dont les cellules sont difficilement distinguables ou trop nombreuses (*Aphanizomenon* ou *Microcystis*), le nombre de cellules pourra être estimé par individu.

Pour les diatomées seules les frustules avec plastes (cellules vivantes) sont comptés. Certaines espèces habituellement coloniales comme *Microcystis aeruginosa* peuvent se rencontrées sous forme de cellules isolées. Dans ce cas l'individu compté est la cellule.

Les taxons identifiés lors d'une première prospection de l'échantillon, comme recommandé dans la norme NF EN 15204, non observés par la suite lors du comptage peuvent être mentionnés dans le relevé mais sans abondance. Ainsi ils participeront à la richesse du peuplement observé.

Les résultats seront donnés en **abondance** exprimée en **nombres de cellules par millilitre** d'échantillon et en **biovolume** exprimé en **millimètre cube par litre** correspondant. Cela afin de permettre une comparaison avec les données de la littérature et des autres pays européens.

Le Cemagref et l'INRA mettent à disposition des utilisateurs un outil de comptage informatique (voir le site du Cemagref http://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/) conforme à ces préconisations, facilitant les saisies des noms d'espèces et calculant directement les abondances et les biovolumes correspondants issus de calculs ou disponibles dans la littérature.

Dans le cas de comptage sans l'aide d'un ordinateur, l'Annexe 7 présente une tableau type de saisie au laboratoire contenant l'ensemble des informations nécessaires à l'expression des résultats souhaités.

En ce qui concerne les **biovolumes**, des valeurs types sont proposés pour un grand nombre de taxons. Si les données de l'outil de comptage ne sont pas disponibles pour le taxon observé ou si elles ne correspondent pas à ce qui est observé dans l'échantillon, ces biovolumes doivent être calculés par des mesures réalisées par l'opérateur à la suite du comptage.

Dans ce cas, les mesures seront réalisées sur une **trentaine d'individus** si possible pour obtenir un biovolume moyen. Si le taxon est très peu représenté dans l'échantillon, moins de 30 individus, il sera préféré l'emploi des dimensions moyennes proposées dans la littérature pour calculer le biovolume.

L'outil informatique proposé en téléchargement permet aussi l'export des données pour bancarisation.

6 ARCHIVAGE DES DONNEES

Afin de permettre l'utilisation ultérieure des données acquises sur le compartiment phytoplanctonique des plans d'eau, l'archivage des données brutes minimales doit être **sous forme informatique** et de la forme suivante :

- un tableau ou document reprenant les **données générales sur le plan d'eau et la station de mesure** (caractéristiques, localisation GPS,...) – Annexe 2 ;

- un **tableau des campagnes** avec le nom du plan d'eau, les dates, les conditions météorologiques observées, le nombre et le type de paramètres mesurés et d'échantillons prélevés - Annexe 1 ;

- un tableau récapitulatif des **valeurs de physico-chimie par campagne** : valeur de Secchi, épaisseur de la zone euphotique, profils de température, pH, conductivité, oxygène dissous, chlorophylle (éventuellement), avec les heures de mesures - Annexe 1 ;

- un tableau contenant le **résultat de l'observation** (nom de l'opérateur, date,...) **et du comptage phytoplanctonique** : codes Sandre des taxons, codes 6 lettres des taxons, noms des taxons avec leurs noms d'auteurs, nombres de cellules comptées ainsi que les biovolumes des taxons identifiés. Voir l'Annexe 8 pour un document informatif type ou l'outil de comptage sur le site internet www.hydrobio-dce.cemagref.fr.

L'échantillon doit être conservé pour une durée **minimale de 2 ans** afin de permettre d'éventuelles vérifications d'identifications. Si sa fixation a été faite dans un premier temps par du lugol une deuxième fixation au glutaraldéhyde ou au formol pour permettre la conservation sur les 2 ans est impérative.
Pour faciliter ces vérifications, des photographies des différents taxons rencontrés dans l'échantillon peuvent être prises.

BIBLIOGRAPHIE

Ouvrages généraux :

Arar E., 1997. Method 446.0 - In vitro determination of chlorophylls a, b, c_1 + c_2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. Revision 1.2. National Exposure Research Laboratory, Office of Research and Development U.S.EPA, Ohio. 26 p.

Cemagref, 2003. Protocole actualisé de la diagnose rapide des plans d'eau. Rapport Cemagref - Lyon, Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, 24 p.

Circulaire « surveillance » DCE 2006/16, 13 juillet 2006. Document de cadrage pour la constitution et la mise en œuvre du programme de surveillance (contrôle de surveillance, contrôles opérationnels, contrôles d'enquête et contrôles additionnels) pour les eaux douces de surface (cours d'eau, canaux et plans d'eau). Direction de l'eau, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, 39 p.

NF EN ISO 7027, 2000. *Qualité de l'eau*, Détermination de la turbidité, AFNOR. 25 p.

NF EN 15204, 2006. *Qualité de l'eau*, Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl), AFNOR. 39 p.

NF T 90-117, 1999. *Qualité de l'eau*, Dosage de la chlorophylle a et d'un indice phéopigments, AFNOR. 11 p.

NF T 90-354, 2007. *Qualité de l'eau,* Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD), AFNOR. 79 p.

Pelletier, J. P. & Orand, A. 1978a Appareil de prélèvement d'un échantillon dans un fluide. Brevet d'invention 76.08579.

Pelletier, J. P. & Orand, A. 1978b Bouteille à prélèvement intégré - Mode d'emploi. INRA Thonon, 9 p.

Utermölh H., 1958. Zur vervollkommnung der quantative phytoplanktonmethodik. Mitt. Int. Ver. Limnol., *vol. 9*, 1-38.

Ouvrages de taxinomie :

Cette liste ne constitue pas une bibliographie exhaustive sur le phytoplancton, mais présente les documents utilisés actuellement, à des degrés divers, pour la détermination des taxons phytoplanctoniques dans le cadre de l'application de relevé en plan d'eau.

*Les **références de base**, à considérer comme nécessaires à une application en routine, sont indiquées par un **astérisque**.*

Anagnostidis, K.; Komarek, J., 1985. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 1 - Introduction, *Archiv für Hydrobiologie*, *Suppl 71*,1-2, 291-302.

Anagnostidis, K.; Komarek, J., 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes 3 - Oscillatoriales, *Archiv für Hydrobiologie*, *suppl. 80*,1-4, 327-472.

Anagnostidis, K.; Komarek, J., 1990. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 5 - Stigonematales, *Archiv für Hydrobiologie*, *Suppl 86*,Algological Studies 59, 1-73.

*Barber, H. G.; Haworth, E. Y., 1981. *Scientific publication N°44.* A guide to the morphology of the Diatom Frustule, Ambleside, GBR, Freshwater biological association. 112 p.

Bornet, E.; Flahault, C., 1959. Révision des Nostocacées hétérocystées contenues dans les principaux herbiers de France, Weinheim, DEU, J. Cramer. 262 p.

*Bourrelly, P., 1966. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique.* Tome I : Les algues vertes, (N. Boubée & Cie ed.), Paris, Boubée. 511 p.

*Bourrelly, P., 1968. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique.* Tome II : Les algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées, (N. Boubée & Cie ed.), Paris, Boubée. 438 p.

*Bourrelly, P., 1970. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique.* Tome III : Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines, (N. Boubée & Cie ed.), Paris, Boubée. 512 p.

*Compère, P., 1986. Flore pratique des algues d'eau douce de Belgique : t.1 Cyanophyceae, Meise, BEL, Jardin Botanique National de Belgique. 120 p.

*Compère, P., 1989. Flore pratique des algues d'eau douce de Belgique : t.2 Pyrrhophytes (Cryptophyceae, Dinophyceae), Raphidophytes (Raphidophyceae), Euglenophytes (Euglenophyceae), Meise, BEL, Jardin Botanique National de Belgique. 208 p.

*Compère, P., 1991. Flore pratique des algues d'eau douce de Belgique : t.3 Rhodophytes, Meise, BEL, Jardin Botanique National de Belgique. 55 p.

*Compère, P., 2001. Flore pratique des algues d'eau douce de Belgique : t.5 Desmidiees 1 Mesotaeniaceae, Gonatozygaceae, Peniaceae, Closteriaceae, Meise, BEL, Jardin Botanique National de Belgique. 69 p.

*Cox, E. J., 1996. Identification of freshwater diatoms from live material, London, GBR, Chapman & Hall. 158 p.

Croasdale, H.; Bicudo, C. E. d. M.; Prescott, G. W., 1983. A synopsis of north american desmids part II Desmidiaceae: Placodermae section 5: the filamentous genera, Lincoln, USA, University of Nebraska press. 117 p.

Czurda, V., 1932. *Die Susswasser-flora Mitteleuropa heft 9.* Zygnemales, Jena, DEU, Verlag von Gustav Fischer. 232 p.

Dillard, G. E., 1999. Common freshwater algae of the United States: an illustrated key to the genera (excluding the diatoms), Berlin, DEU, J. Cramer. 173 p.

*Dillard, G. E., 2000. *Bibliotheca phycologica, band 106.* Freshwater algae of the Southeastern United States: Part 7. Pigmented Euglenophyceae, Berlin, DEU, Cramer. 176 p.

Drouet, F., 1973. Revision of the Nostocaceae with cylindrical trichomes, New York, USA, Hafner Press. 292 p.

*Ettl, H., 1978. *Susswasserflora von Mitteleuropa 3.* Xanthophyceae: 1. Teil, Stuttgart, DEU, Gustav Fischer Verlag. 530 p.

*Ettl, H., 1983. *Susswasserflora von Mitteleuropa 9.* Chlorophyta I: Phytomonadina, Stuttgart, DEU, Gustav Fischer Verlag. 807 p.

*Ettl, H.; Gärtner, G., 1988. *Susswasserflora von Mitteleuropa 10.* Chlorophyta II: Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales, Stuttgart, DEU, Gustav Fischer Verlag. 807 p.

*Förster, K.; Huber Pestalozzi, G., 1982. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 8 teil 1. halfte : Conjugatophycae, Zygnematales und Desmidiales (excl. Zygnemataceae), (e. schweizebart'sche verlagsbuchhandlung (nagele u obermiller) ed.), Stuttgart. 543 p.

*Fott, B.; Huber Pestalozzi, G., 1972. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 6 teil Chlorophyceae (Grunalgen) ordnung : Tetrasporales, (E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung ed.), Stuttgart, DEU. 150 p.

Geissler, U.; Hakansson, H.; Miller, U., et al., 1990. *Beihefte zur Nova Hedwigia heft 100.* Contributions to the knowledge of microalgae particularly diatoms, Berlin, DDR, J. Cramer. 300 p.

Gemeinhardt, K., 1971. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 12.* Chlorophyceae 4. Abteilung. Oedogoniales, New York, USA, Johnson reprint corporation. 453 p.

Gemeinhardt, K.; Schiller, J., 1971. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 10.* Flagellatae 2. Abteilung. Silicoflagellatae: Coccolithineae, New York, USA, Johnson reprint corporation. 589 p.

Germain, H., 1981. *Faunes et flores actuelles.* Flore des diatomées Diatomophycées - eaux douces et saumâtres du Massif Armoricain et des contrées voisines d'Europe occidentale, (Société Nouvelle des Editions Boubée ed.), Paris. 444 p.

Guiry, M. D.; Guiry, G. M., 2008. AlgaeBase version 4.2. World-wide electronic publication, (National University of Ireland ed.). Galway. http://www.algaebase.org.

Guttinger, W., 1991. *Collection of sem-micrographs.* Series 5 Diatoms, Pura, CH, Guttinger W. 57 p.

Hintz, G., 1990. *Cryptogamica helvetica.* Diatomeen aus der umgebung von zermatt. *(Vol. 17)*, Genève, CH, Conservatoire et Jardin Botaniques. 175 p.

*Huber Pestalozzi, G., 1969. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 4 teil Euglenophyceen, (E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung ed.), Stuttgart, DEU. 606 p.

*Huber Pestalozzi, G., 1976. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 2 teil 1 Halfte Chrysophyceen farblose flagellaten heterokonten, (E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung ed.), Stuttgart, DEU. 365 p.

*Huber Pestalozzi, G.; Fott, B., 1968. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 3 teil Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae 2. Auflage, (E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung ed.), Stuttgart, DEU. 322 p.

Huber Pestalozzi, G.; Thienemann, A., 1942. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 2 teil 2 Halfte Diatomeen, Stuttgart, DEU, E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung. 549 p.

*Huber Pestalozzi, G.; Thienemann, A., 1974. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 5 teil Chlorophyceae (Grünalgen) ordnung: Volvocales, (E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung ed.), Stuttgart, DEU. 1300 p.

Jahn, R.; Kociolek, J. P.; Witkowski, A., et al., 2001. Lange - bertalot - festschrift: studies on diatoms: dedicated to prof. dr. dr. h. c. horst lange-bertalot on the occasion of his 65 th birthday, Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft. 633 p.

Jahn, R.; Meyer, B.; Preisig, H. R., 1997. *Nova Hedwigia, vol.65, n°1-4.* Microalgae: aspects of diversity and systematics, Stuttgart, J. Cramer. 452 p.

*John, D. M.; Brook, A. J.; Whitton, B. A., 2002. The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae., (Cambridge University Press ed.), Cambridge. 702 p.

*Kadlubowska, J. Z., 1984. *Susswasserflora von Mitteleuropa 16.* Chlorophyta VIII: Conjugatophyceae I: Zygnemales, Jena, DEU, VEB Gustav Fischer Verlag. 531 p.

Kargupta, A. N.; Jha, R. N., 2004. Algal flora of Bihar (Zignemataceae), Dehra Dun, Bishen Singh Mahendra Pal Singh. 237 p.

Kolkwitz, R.; Krieger, H., 1971. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 13.* 2. Abteilung. Zygnemales: Lieferung 1-4, New York, USA, Johnson reprint corporation. 163 p.

Komarek, J.; Anagnostidis, K., 1986. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 2 - Chroococcales, *Archiv für Hydrobiologie*, *Suppl 73*,2, 157-226.

*Komarek, J.; Anagnostidis, K., 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales, *Archiv für Hydrobiologie*, *Suppl 82*,3, 247-345.

*Komarek, J.; Anagnostidis, K., 1999. *Susswasserflora von Mitteleuropa 19.* Cyanoprokaryota 1.Teil: Chroococcales, (Gustav Fischer ed.), Stuttgart, Gustav Fischer. 548 p.

*Komarek, J.; Anagnostidis, K., 2005. *Susswasserflora von Mitteleuropa 19.* Cyanoprokaryota 2.Teil: Oscillatoriales, (Elsevier SpeKtrum Akademischer Verlag ed.), München, Elsevier. 759 p.

*Komarek, J.; Fott, B.; Huber Pestalozzi, G., 1983. *Die binnengewasser, band XVI.* Das phytoplankton des susswassers systematik und biologie: 7 teil 1 Halfte Chlorophyceae (Grunalgen) ordnung : Chlorococcales, (E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung ed.), Stuttgart, DEU. 1044 p.

Krammer, K., 1997. *Bibliotheca diatomologica, band 36.* Die cymbelloiden diatomeen: eine monographie der weltweit bekannten taxa : teil 1 allgemeines und Encyonema part, Berlin, DEU, J. Cramer. 382 p.

Krammer, K., 1997. *Bibliotheca diatomologica, band 37.* Die cymbelloiden diatomeen: eine monographie der weltweit bekannten taxa : teil 2 Encyonema part., Encyonopsis and Cymbellopsis, Berlin, Allemagne, J. Cramer. 469 p.

Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 1985. *bibliotheca diatomologica band 9.* Naviculaceae: neue und wenig bekannte taxa, neue kombinationen und synonyme sowie bemerkungen zu einigen gattungen, Stuttgart, J. Cramer. 230 p.

*Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 1991. *Susswasserflora von mitteleuropa 2.* Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. 576 p.

*Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 1999. *Susswasserflora von mitteleuropa 2.* Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae, Berlin, Allemagne, Specktrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. 876 p.

*Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 2000. *Susswasserflora von Mitteleuropa 2.* Bacillariophyceae Part 5: English and french translation of the keys, Berlin, DEU, Spektrum. 311 p.

Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 2000. Diatoms of europe: vol. 1 the genus Pinnularia, Ruggell, GER, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 703 p.

Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 2001. Diatoms of europe: vol. 2 Navicula sensu stricto 10 genera separated from Navicula sensu lato Frustulia, Ruggell, GER, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 526 p.

Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 2002. Diatoms of europe: vol. 3 Cymbella, Ruggell, GER, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 584 p.

Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 2003. Diatoms of europe: vol. 4 Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocymbella, Ruggell, GER, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 530 p.

*Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 2004. *Susswasserflora von Mitteleuropa 2.* Bacillariophyceae 4 Teil: Achnanthaceae Kritische ergänzungen zu Achnanthes s.l., Bavicula s. str., Gomphonema, Berlin, DEU, Spektrum. 468 p.

*Krammer, K.; Lange Bertalot, H., 2007. *Susswasserflora von Mitteleuropa 2.* Bacillariophyceae 2. Teil : Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, Munich, DEU, Elsevier. 610 p.

Krieger, W., 1937. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 13.* Conjugatae 1. Abteilung. Die desmidiaceen 1. Teil, New York, USA, Johnson reprint corporation. 808 p.

Krieger, W., 1939. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 13.* 1. Abteilung. Die desmidiaceen 2. Teil Lieferung 1, New York, USA, Johnson reprint corporation. 163 p.

*Kristiansen, J.; Preisig, H. R., 2007. *Susswasserflora von Mitteleuropa 1.* Chrysophyte and haptophyte algae: Part 2: Synurophyceae, (2° ed.), Berlin, DEU, Spektrum Akademisher Verlag. 252 p.

Kumano, S., 2002. Freshwater Red Algae of the World, (Biopress Limited ed.), Bristol, Biopress Ltd. 375 p.

Kylin, H., 1956. Die gattungen der rhodophyceen, Lund, DEU, Cwk Gleerups Förlag. 673 p.

*Lange Bertalot, H., 1993. *Bibliotheca diatomologica, band 27.* 85 neue taxa und über 100 weitere neu definierte taxa ergänzend zur Süsswasserflora von Mitteleuropa : vol.2 part.1-4, Berlin, DEU, Cramer. 454 + 100 env p.

*Lange Bertalot, H.; Krammer, K., 1987. *bibliotheca diatomologica band 15.* Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, STUTTGART ,J. CRAMER, BERLIN. 289 p.

Lange Bertalot, H.; Krammer, K., 1989. Achnanthes : eine monographie der gattung, Berlin - Stuttgart, J.Cramer. 393 p.

Lange Bertalot, H.; Metzeltin, D., 1996. *Iconographia diatomologica, vol. 2.* Indicators of oligotrophy, Konigstein, DEU, Koeltz Scientific Books. 390 p.

*Leitao, M.; Couté, A., 2005. *Eau et Santé.* Guide pratique des Cyanobactéries planctoniques du Grand Ouest de la France., (DEPEE-DLM Honfleur ed.), Honfleur, Agences de l'Eau Seine Normandie. 64 p.

*Lenzenweger, R., 1996. *Bibliotheca phycologica, band 101.* Desmidiaceenflora von Österreich. Teil 1, Berlin, DEU, Cramer. 162 p.

*Lenzenweger, R., 1997. *Bibliotheca phycologica, band 102.* Desmidiaceenflora von Österreich. Teil 2, Berlin, DEU, Cramer. 216 p.

*Lenzenweger, R., 1999. *Bibliotheca phycologica, band 104.* Desmidiaceenflora von Österreich. Teil 3, Berlin, DEU, Cramer. 218 p.

*Lenzenweger, R., 2003. *Bibliotheca phycologica, band 111.* Desmidiaceenflora von Österreich. Teil 4, Berlin, DEU, Cramer. 87 p.

*Mrozinska, T., 1985. *Susswasserflora von Mitteleuropa 14.* Chlorophyta VI: Oedogoniophyceae: Oedogoniales, Jena, DEU, VEB Gustav Fischer Verlag. 624 p.

Nagumo, T., 2003. *Bibliotheca diatomologica, band 49.* Taxonomic studies of the subgenus Amphora Cleve of the genus Amphora (Bacillariophyceae) in Japan, Berlin, Allemagne, J. Cramer. 265 p.

Ognjanova Rumenova, N.; Manoylov, K., 2006. Advances in phycological studies: festschrift in honour of Prof. Dobrina Temniskova Topalova, Sofia, RUS, Pensoft. 383 p.

Pascher, A.; Schiller, J.; Migula, W., 1925. *Die süsswasser flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, heft 11.* Heterokontae, Phaeophyta, Rhodophyta, Charophyta, Jena, DEU, Verlag von Gustav Fischer. 250 p.

Pascher, A.; Vischer, W., 1939. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 11.* Heterokonten, New York, USA, Johnson reprint corporation. 1092 p.

Pentecost, A., 1984. Introduction to freshwater algae, Richmond, GBR, Richmond Publishing Co. 247 p.

*Popovsky, J.; Pfiester, L. A., 1990. *Susswasserflora von Mitteleuropa 6.* Dinophyceae (Dinoflagellida), Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. 272 p.

Prescott, G. W.; Bicudo, C. E. d. M.; Vinyard, W. C., 1982. A synopsis of north american desmids part II: Desmidiaceae: Placodermae section 4, Lincoln, USA, University of Nebraska press. 700 p.

Prescott, G. W.; Hannah, T.; Croasdale, H. T., et al., 1975. A synopsis of north american desmids part II: Desmidiaceae: Placodermae section 1, Lincoln, USA, University of Nebraska Press. 275 p.

Prescott, G. W.; Hannah, T.; Croasdale, H. T., et al., 1977. A synopsis of north american desmids part II: Desmidiaceae: Placodermae section 2, Lincoln, USA, University of Nebraska Press. 413 p.

Prescott, G. W.; Hannah, T.; Croasdale, H. T., et al., 1981. A synopsis of north american desmids part II: Desmidiaceae: Placodermae section 3, Lincoln, USA, University of Nebraska press. 720 p.

Ramanathan, K. R., 1964. Ulotrichales, New Delhi, IND, Indian council of agricultural research. 188 p.

Randhawa, M. S., 1959. Zygnemaceae, New Delhi, IND, Indian council of agricultural research. 478 p.

Reichardt, E., 1999. *Iconographia diatomologica, vol 8.* Z ; i ; mur revision der gattung *Gomphonema* : die arten um *G. affine/insigne, G. angustatum/microspus, G. acuminatum* sowie gomphonemoide diatomeen aus dem oberoligozän in böhmen, Rugell, ARG. 203 p.

*Rieth, A., 1980. *Susswasserflora von Mitteleuropa 4.* Xanthophyceae: 2. Teil, Stuttgart, DEU, Gustav Fischer Verlag. 147 p.

Ruck, E. C.; Kociolek, J. P., 2004. *Bibliotheca diatomologica, band 50.* Preliminary phylogeny of the family Surirellaceae (Bacillariophyta), Berlin, DEU, Cramer. 236 p.

Ruzicka, J., 1977. Die desmidiaceen mitteleuropas band 1: 1.Lieferung, Stuttgart, DEU, E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung. 337 p.

Ruzicka, J., 1981. Die desmidiaceen mitteleuropas band 1: 2.Lieferung, Stuttgart, DEU, E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung. 809 p.

Schiller, J., 1933. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 10.* Flagellatae 3. Abteilung. Dinoflagellatae (Peridineae) in monographischer behandlung: 1. Teil, New York, USA, Johnson reprint corporation. 617 p.

Schiller, J., 1937. *Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora 10.* Flagellatae 3. Abteilung. Dinoflagellatae (Peridineae) in monographischer behandlung: 2. Teil, New York, USA, Johnson reprint corporation. 589 p.

Siver, P. A.; Hamilton, P. B.; Stachura Suchoples, K., et al., 2005. *Iconographia diatomologica, vol. 14.* Diatoms of North America: the freshwater flora of Cape Cod, Ruggell, Allemagne, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 463 p.

Starmach, K., 1974. *Flora Slodkowodna Polski*, Cryptophyceae, Dinophyceae, Raphidophyceae, Warszawa, Krakow, 520p.

Starmach, K., 1977. *Flora slodkowodna polski, tom 14.* Phaeophyta, Rhodophyta: with keys for the identification of fresh water brown and red algae mentioned in the volume, Kradow, POL, Instytut botaniki. 445 p.

Starmach, K., 1980. *Flora Slodkowodna Polski*, Chrysophyceae, Warszawa, Krakow, 775p.

Starmach, K., 1985. *Susswasserflora von Mitteleuropa 1.* Chrysophyceae und haptophyceae, Jena, DEU, VEB Gustav Fischer Verlag. 515 p.

Tanaka, H., 2007. *Bibliotheca diatomologica band 53.* Taxonomic studies of the genera Cyclotella (Kützing) Brébisson, Discostella Houk et Klee and Puncticulata Hakansson in the family Sephanodiscaceae Glezer et Makarova (Bacillariophyta) in Japan, Berlin, DEU, J. Cramer. 205 p.

Vivier, P.; Hartley, B.; Barber, H. G., et al., 1996. An atlas of british diatoms, Bristol, GBR, Biopress Limited. 601 p.

*Wehr, J. D.; Sheath, R. G., 2003. Freshwater algae of North America: ecology and classification, Amsterdam, NLD, Academic press. 918 p.

Werum, M.; Lange Bertalot, H., 2004. *Iconographia diatomologica, vol. 13.* Ecology, hydrogeology, taxonomy, Ruggell, Allemagne, A.R.G. Gantner Verlag K.G. 480 p.

ANNEXES

Annexe 1 : Document type de relevé de campagne de mesure (informatif).

Ce document peut subir des modifications, voir le site Internet du Cemagref (http://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/) pour disposer de la dernière version.

Relevé phytoplanctonique en plan d'eau *v.3.3.1*

DONNEES GENERALES CAMPAGNE

Septembre 2009

Plan d'eau :		**Date :**	
Station ou n° d'échantillon :		**Code lac :**	
Organisme / opérateur :		**Réf. dossier :**	

STATION

Coordonnées de la station	relevées sur : ❑ GPS ❑ carte IGN			
Lambert 93(système français)	*(en m)* **X :**	**Y :**	altitude :	m
WGS 84 (système international)	données GPS *(en dms)* **N :**	__ **:**	altitude :	m
Profondeur :	m			
Conditions d'observation :	**vent** : ❑ nul ❑ faible ❑ moyen ❑ fort			
	météo : ❑soleil ❑faiblement nuageux ❑très nuageux ❑pluie fine ❑pluie forte ❑crépuscule			
	Surface de l'eau : ❑ lisse ❑ faiblement agitée ❑ agitée ❑ très agitée			
	Hauteur des vagues : m			
	Bloom algal : ❑ oui ❑ non			
Marnage :	: ❑ oui ❑ non	**niveau des eaux par rapport à la végétation de ceinture (pour les plans d'eau marnant) :**	m	
Remarques :				

PRELEVEMENTS

Heure début de relevé :		**Heure de fin de relevé** :	
Prélèvements réalisés :	❑ phytoplancton ❑ chlorophylle ❑ eau	**Matériel employé :**	❑ bouteille intégratrice ❑ bouteille Van Dorn ❑ pompe
	❑ sédiment ❑ macrophytes ❑ oligochètes ❑ autres, préciser :	**Volume filtré pour la chlorophylle** :	ml
		Volume de Lugol ajouté pour le phytoplancton :	ml
Remarques, observations :			

Relevé phytoplanctonique en plan d'eau v.3.3.1

DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES

Septembre 2009

Plan d'eau :		**Date :**	
Station ou n° d'échantillon :		**Code lac :**	
Organisme / opérateur :		**Réf. dossier :**	

TRANSPARENCE

Secchi en m :		**Zone euphotique (2,5 x Secchi) :**	

PROFIL VERTICAL

Moyen utilisé : ❑ mesures *in-situ* à chaque prof. ❑ mesures en surface dans un récipient

Echantillon phytoplancton	**Prof (m)**	**Temp (°C)**	**pH**	**Conductivité à 25°C (µS.cm^{-1})**	**O_2 (%)**	**O_2 (mg/l)**	**Chlorophylle µg/l**	**Heure**
	Intégré : à							
	0							
	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
	9							
	10							
	11							
	12							
	13							
	14							
	15							
	16							
	17							
	18							
	19							
	20							
	21							
	22							

PROFIL VERTICAL *(suite)*

Echantillon phytoplancton	**Prof (m)**	**Temp (°C)**	**pH**	**Conductivité à 25°C (µS.cm^{-1})**	**O_2 (%)**	**O_2 (mg/l)**	**Chlorophylle µg/l**	**Heure**

Annexe 2 : Document type de caractérisation du plan d’eau et de la station de mesure (informatif).

Ce document peut subir des modifications, voir le site Internet du Cemagref (http://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/) pour disposer de la dernière version.

Relevé phytoplanctonique en plan d'eau *v.3.3.1*

DONNEES GENERALES PLAN D'EAU - STATION

Septembre 2009

Plan d'eau :		**Date :**	
Station :		**Code lac :**	
Organisme / opérateur :		**Réf. dossier :**	

LOCALISATION PLAN D'EAU

Commune :			
Lac Marnant :	: ❑ oui ❑ non	**HER :**	
Superficie du bassin versant :	km²		
Superficie du plan d'eau :	ha		
Profondeur maximale :	m	**Profondeur moyenne :**	m
Carte : (extrait IGN 1/25 000ème)	Indiquer le Nord		

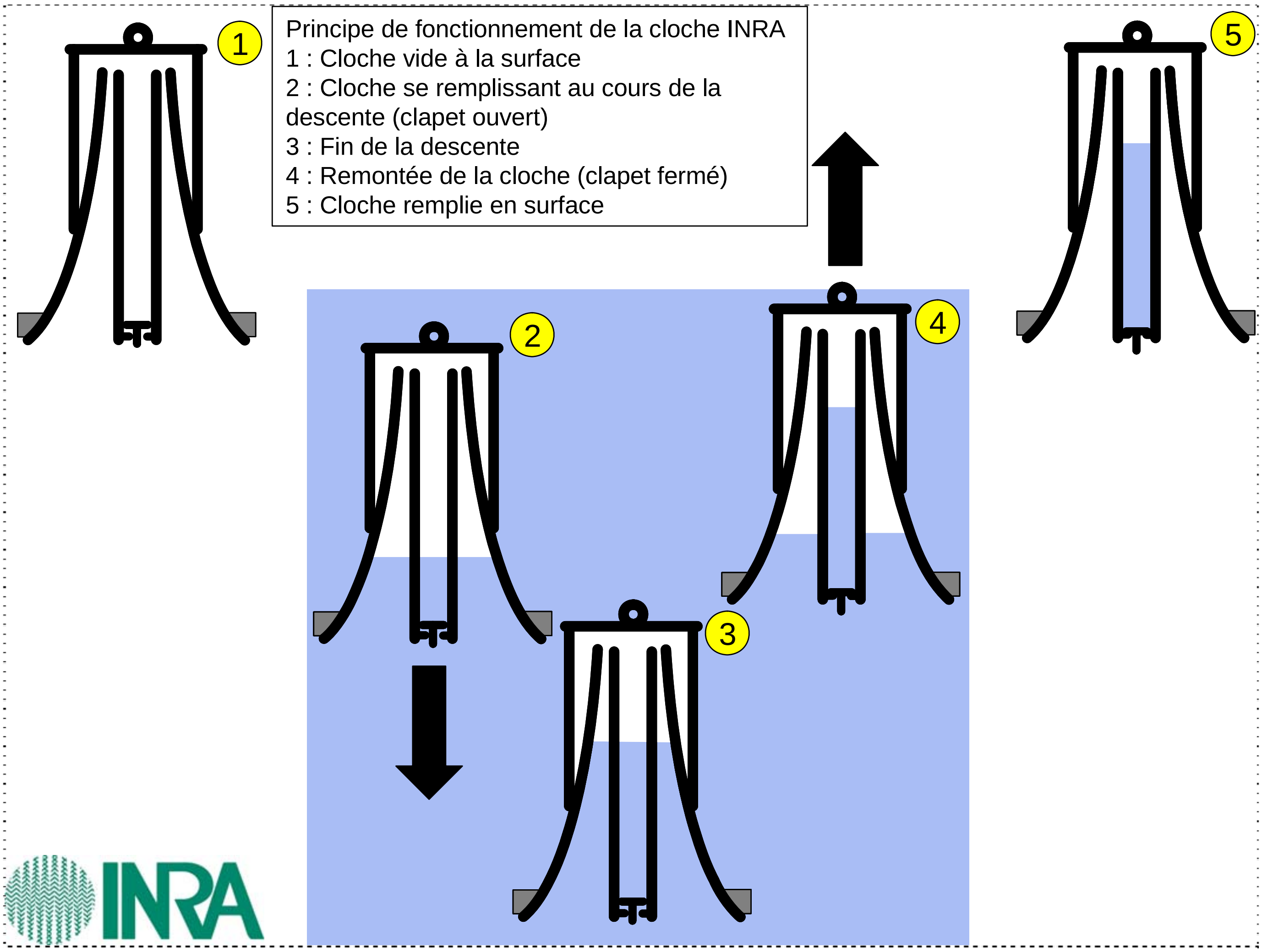
STATION

Coordonnées de la station	relevées sur : ❑ GPS ❑ carte IGN
Lambert 93(système français)	*(en m)* **X :** **Y :** altitude : m
WGS 84 (système international)	données GPS *(en dms)* **N :** __ **:** altitude : m
Profondeur :	……………..m
Photos du site : (indiquer l'angle de prise de vue sur la carte)	
Remarques et observations :	

Annexe 3 : Schéma descriptif du système et du fonctionnement de la bouteille de prélèvement intégré INRA.

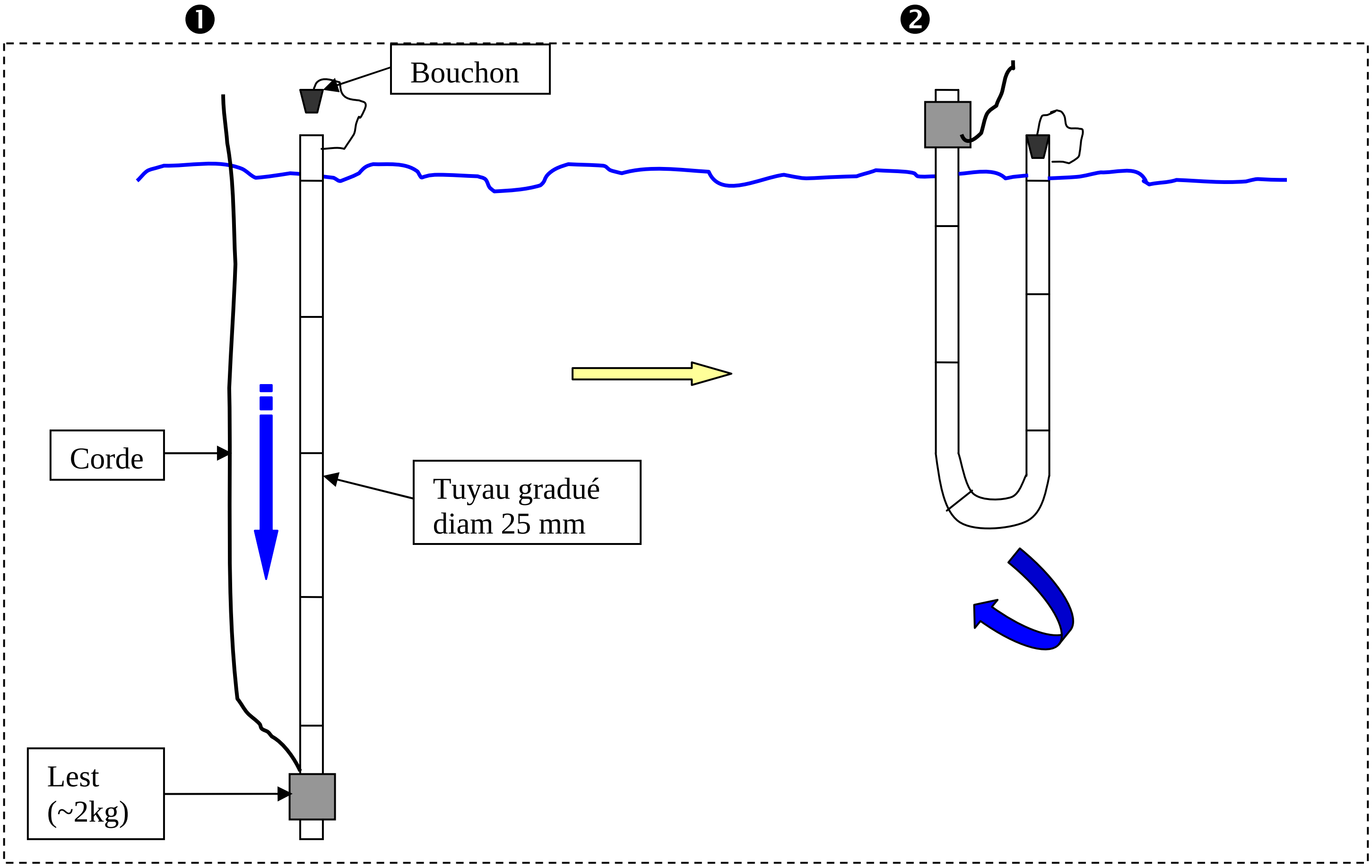


Photo de la bouteille de prélèvement intégré INRA (Pelletier & Orand 1978)



Annexe 4 : Schéma descriptif du système et du fonctionnement du préleveur intégré utilisant un tuyau.

Version simple

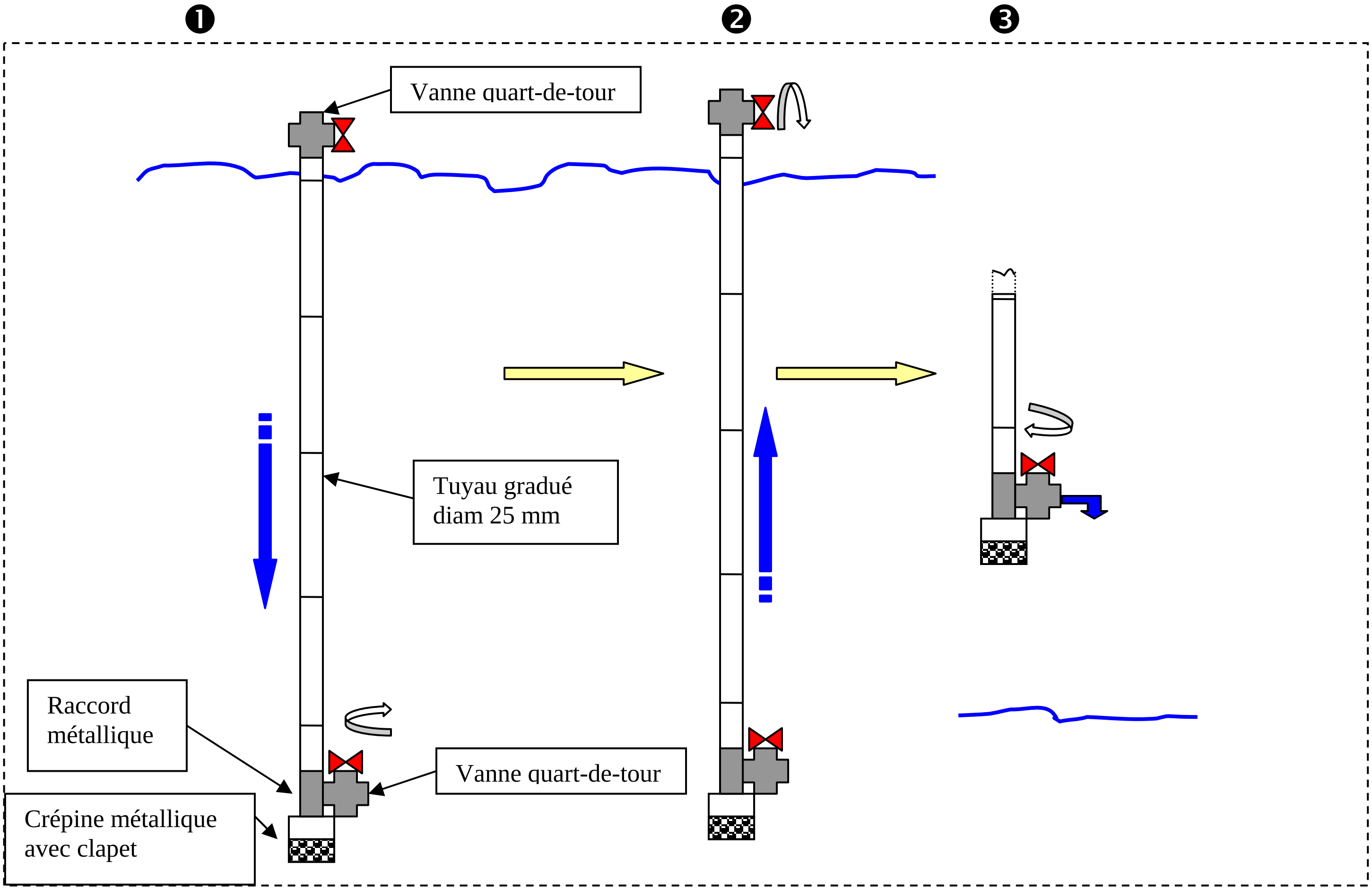


➊ Le tuyau est descendu lentement dans la colonne d'eau jusqu'à la profondeur maximale de prélèvement souhaitée (fin de la zone euphotique) ;

➋ Le bouchon est placé sur le sommet du tuyau. En tirant sur la corde, le tuyau est ramené à la surface en partant du fond. L'échantillon ainsi prélevé est transféré dans un récipient propre (type seau) pour y être homogénéisé avant prise de sous-échantillons.

N.B. : un tuyau translucide (type cristal) est requis pour s'assurer du maintien en état de propreté de l'intérieur. Un diamètre de 25 mm et une longueur de 10 m peut convenir tout dépend du volume d'échantillon final souhaité.
Cet appareil doit être stocké à l'abri de la lumière pour éviter les développements algaux intempestifs dans le tuyau.

Version améliorée



❶ Après fermeture de la vanne du fond, le tuyau est descendu lentement dans la colonne d'eau jusqu'à la profondeur maximale de prélèvement souhaitée (fin de la zone euphotique) ;

❷ La vanne quart-de-tour de surface est fermée. Le tuyau est ramené à la surface comme il a été descendu, sans à-coup important.

❸ L'échantillon ainsi prélevé est transféré en ouvrant la vanne du fond dans un récipient propre (type seau) pour y être homogénéisé avant prise de sous-échantillons.

N.B. : La crépine doit être munie d'un clapet anti retour dont on enlève le ressort de rappel. Un tuyau translucide (type cristal) est requis pour s'assurer du maintien en état de propreté de l'intérieur. Un diamètre de 25 mm et une longueur de 10 m peut convenir tout dépend du volume d'échantillon final souhaité.

Cet appareil doit être stocké à l'abri de la lumière pour éviter les développements algaux intempestifs dans le tuyau.

Annexe 5 : Préparation des fixateurs.

SOLUTIONS DE FIXATION DES ECHANTILLONS

1- La solution iodo-iodurée de Lugol alcalin

- Iode en paillettes 10 g,
- Iodure de potassium 20 g,
- Acétate de sodium 20 g,
- Eau distillée 200 ml.

Broyer au mortier l'iode (I_2) et l'iodure de potassium (IK) avec un peu d'eau. Compléter en eau distillée. Agiter jusqu'à complète dissolution.
Puis ajouter 20 g d'acétate de sodium (CH3COO-Na). Lorsque la solution est proche de la saturation, il convient d'éliminer tout précipité éventuel en faisant décanter la solution avant utilisation.

UTILISATION : ajouter à l'eau de l'échantillon pour une concentration finale de **0,5%, soit 8 gouttes pour 100ml** afin d'obtenir une couleur brun clair (whisky). Si perte de cette couleur dans le temps alors ajouter quelques gouttes de plus.

IDENTIFICATION DES DANGERS : Produit non considéré comme dangereux selon la Directive 67/548/CEE.

2- La solution de glutaraldéhyde

- glutaraldéhyde à 50 %,
- cacodylate de sodium.

Tamponner la solution de glutaraldéhyde avec le cacodylate de sodium à pH neutre.

UTILISATION : ajouter à l'eau de l'échantillon pour une concentration finale de **0,5 %**

IDENTIFICATION DES DANGERS : Nocif en cas d'ingestion. Toxique par inhalation. Provoque des brûlures. Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et par contact avec la peau. Très toxique pour les organismes aquatiques.

3- La solution de formol

Solution de formol du commerce à 37 % de formaldéhyde.

UTILISATION : ajouter à l'eau de l'échantillon pour une concentration finale de **5 %** (en volume).

IDENTIFICATION DES DANGERS : Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Provoque des brûlures. Toxique: danger d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Effet cancérogène suspecté - preuves insuffisantes. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

Annexe 6 : Tableau d'aide au choix du volume de sédimentation.

La préconisation suivante, basée sur la transparence mesurée au disque de Secchi lors de la campagne de mesure, peut servir de base pour le choix du volume à sédimenter :

Valeur du Secchi (m)	Volume de la chambre (ml)
> 6	100
4 – 6	50
2 – 4	25
1 – 2	10
< 1	< 10 ou dilution

Annexe 7 : Tableau type de saisie des données du comptage phytoplanctonique.

Ce document peut subir des modifications, voir le site Internet du Cemagref (http://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/) pour disposer de la dernière version.

Relevé phytoplanctonique en plan d'eau *v.3.3.1*

Comptage du phytoplancton *(méthode Utermöhl)* ***Septembre 2009***

Plan d'eau :		**Date :**	
Station ou n° d'échantillon :		**Code lac :**	
Taxinomiste :		**Réf. dossier :**	

COMPTAGE ❑ CHAMPS ALEATOIRES ❑ TRANSECTS

Volume sédimenté en ml (v) :		**Dilution :**	❑ oui ❑ non ; si oui facteur de dilution **(d)**:
Surface de la chambre en mm^2 (A) :		Le nombre d'objet/ml du taxon i (**N_i**) est obtenu avec : **$N_i = (x_i/c)*[(Ad)/(av)]$** *Conforme à la norme EN15204*	
Surface d'un champ[4] **en mm^2 (a) :**		**Remarques, observations :**	
Nbre de champs comptés (c) :		**Nbre total d'individus comptés :**	

Code taxon	**Libellé objet (cel., col., fil.)** [5]	**Nom du taxon**	**Cf.**	**Biovol./obj. (µm^3)**	**Nbre d'objets comptés (x_i)**

[4] Dans le cas de comptage de transects, la surface d'un champ correspond à la surface d'un transect.
[5] Choix de l'objet compté. cel. : cellule ; col. : colonie ; fil. : filament (par 100µm de long).

Code taxon	**Libellé objet (cel., col., fil.)** [6]	**Nom du taxon**	**Cf.**	**Biovol./obj. (μm^3)**	**Nbre d'objets comptés (x_i)**

[6] Choix de l'objet compté. cel. : cellule ; col. : colonie ; fil. : filament (par 100µm de long).

Annexe 8 : Tableau type de rendu du résultat d'un comptage phytoplanctonique.

Ce document peut subir des modifications, voir le site Internet du Cemagref (http://www.hydrobio-dce.cemagref.fr/) pour disposer de la dernière version.

Relevé phytoplanctonique en plan d'eau *v.3.3.1*

Résultats comptage du phytoplancton *(méthode Utermöhl)*

Septembre 2009

Plan d'eau :		**Date :**	
Station ou n° d'échantillon :		**Code lac :**	
Taxinomiste :		**Réf. dossier :**	

COMPTAGE		**Remarques, observations :**					
Code Sandre	**Code taxon**	**Nom du taxon**	**Auteur**	**Cf.**	**Abondance (cell/ml)**	**Biovolume (mm^3/l)**	**Commentaires**

Code Sandre	**Code taxon**	**Nom du taxon**	**Auteur**	**Cf.**	**Abondance (cell/ml)**	**Biovolume (mm^3/l)**	**Commentaires**

Cemagref
Sciences, eaux & territoires

Direction générale
Parc de Tourvoie
BP 44 - 92163 Antony cedex
Tél. 01 40 96 61 21 - Fax 01 40 96 62 25
www.cemagref.fr